



Dynamic Search: JAPIO - Patent Abstracts of Japan

Records for: JP 4197182

[show as alert...](#)

[show strategy only...](#)

Output Format: **Full Record** Destination: **Browser** **display / send**
 Modify **refine search**
 select **back to picklist**
 all **none** Records 1 of 1 In full Format

1/19/1

03832082 **Image available**

DNA CODING ALKALINE PROTEASE YA ENZYME AND PRODUCTION OF ALKALINE F THE DNA

Pub. No.: 04-197182 [JP 4197182 A]

Published: July 16, 1992 (19920716)

Inventor: TOBE SEIICHI

ODERA MOTOYASU

ASAII YOSHIO

Applicant: LION CORP [000676] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 02-327110 [JP 90327110]

Filed: November 28, 1990 (19901128)

INTL CLASS: International Class: 5] C12N-015/57; C11D-003/386; C12N-009/54; C12I
C12N-009/54; C12R-001/07

JAPIO Class: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1 (ORGANIC C
Compounds); 14.6 (ORGANIC CHEMISTRY -- Liquid Fuel, Oils & Fats)

Journal: Section: C, Section No. 1000, Vol. 16, No. 524, Pg. 33, October 28, 1992 (1992102

ABSTRACT

NEW MATERIAL: DNA coding alkaline protease Ya enzyme.

EXAMPLE: The DNA having the amino acid sequence of formula.

USE: Production of alkaline protease Ya, etc.

PREPARATION: The DNA can be produced by gene recombination technique.

AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyr

21

GlyClnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArg

41

SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGly

61

AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeu

81

LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIleMet

101

GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAla

121

GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyr

401

ValPheIleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAla

421

433

ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValAla

⑪ 公開特許公報 (A)

平4-197182

⑫ Int. Cl.

C 12 N 15/57
 C 11 D 3/386
 C 12 N 9/54
 (C 12 N 15/57
 C 12 R 1:07)
 (C 12 N 9/54
 C 12 R 1:07)

識別記号

Z NA

府内整理番号

7614-4H
7823-4B

⑬ 公開 平成4年(1992)7月16日

8717-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全17頁)

A

⑭ 発明の名称

アルカリプロテアーゼY a 酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY aの製造方法

⑮ 審 題 平2-327110

⑯ 出 願 平2(1990)11月28日

⑰ 発 明 者 戸 部 聖 一 神奈川県中郡二宮町山西457

⑰ 発 明 者 大 寺 基 靖 神奈川県平塚市日向岡2-2-34

⑰ 発 明 者 浅 井 芳 男 神奈川県中郡二宮町百合が丘2-23-3

⑰ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

⑰ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名

明細書

1. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a 酵素をコードするDNA及び該DNAを用いたアルカリプロテアーゼY aの製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) アルカリプロテアーゼY a 酵素をコードするDNA。
- (2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記載のDNA。

1	141	160	
AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr	SerArgGlnValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGly	161	180
21	AsnGluGlyProAsnSerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThr	181	200
41	ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHis	201	220
61	IleAlaGlnPheSerSerArgGlyAlaThrArgAspGlyArgIleLysProAspValThr	221	240
81	AlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTrp	241	260
101	AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProIleVal	261	280
121	AlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArgGlyIleThrProLys	281	300
140	ProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro	301	320
160	SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVal	321	340
180	AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaTyrSerPheGlnAlaGlnAla	341	360
200	GlyLysProLeuLysIleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSer	361	380
220	TyrThrLeuValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVal	381	400
240	GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTyrAspGlyArgAsnAsnValGluAsn		

401 420
 ValPhelleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIlelleGluValGlnAlaTyrAsnVal
 421 433
 ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 60
 AATGATGTACCAAGAGGGATACTAAAGCTGATGTTGCACAAAACAATTACGGATTAT
 61 120
 CGACAAAGGTCAACTAGTTGCACTACCGGACACAGGCTTAGATACAGGTCGTAACCGATAGT
 121 180
 TCTATGCCATGAAGCATTCCGGGGAAAATCACAGCTTTACGCCCTAGGAAGAACTAAT
 181 240
 AATGCCAGTGATCCGAATGGCATGGCACACATGTAACGGTTCTGTAACGGTAATGCT
 241 300
 TTAATAAACGAAATGGCTCCCAAGCTAACTTAGTCTTCCAATCTATTATGGATAGGCC
 301 360
 GGAGGATTAGGTGGCTTACCATCGAACTTAAATACGTTATTTACTCAAGCTTGGAACTC
 361 420
 GGAGCAAGAATTCAACTCTTGGGGAGCCCCAGTAAATGGAGCGTACACTGCTAAC
 421 480
 TCGAGACAAGTGGATGAGTATGTTGAAATAATGATATGACGGTACTTTTGCAGCTGGT
 481 540
 AATGAAGGTCTAATTCAAGAACAAATTAGTGCTCCAGGTACAGGAAAGATGCTATTACG

541 600
 GTCGGCGAACGAAAGACTATGCCCAAGCTTCGGTTGATAGCAGATAACCCAAATCAT
 601 660
 ATTGACAAATTTCATCGAGAGGAGCTACGGGATGGACGAATTAGCCTGACGTAACA
 661 720
 CCTCTGGAACATTATTTATCAGCACGTTCTTCTTAGCTCCAGACTCTCGTTTGC
 721 780
 CGCAATTATAACGTAATACCGTATATGGGGTACCTCCATGGGACACCTATTGTT
 781 840
 CCAGGGAAATGTCGCGCAATTACGTGACCATTTATAAAAAATAGAGGTATTACTCCTAAAG
 841 900
 CCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATCGCTGGCTACTGATGTTGTTTACGATATCCT
 901 960
 ACTGGTACCGAGGCTGGGGCGTGTACTCTAGATAATGTTAAATGTAACGGTATGTC
 961 1020
 AATGAAGCAACTGCAATTAGCCACAGGACAAAAGCAACGTTACGTTCCAAGCACAGG
 1021 1080
 GTAAACCTTAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCTGGAAAGTACAACGTCATCT
 1081 1140
 TATACACTAGTTAATGATTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGACAAAAAATATGTA
 1141 1200
 GGAAATGATTITAGTTATCCTTATGATAATAACTGGATGGTCGCAACAAATGTTGAGAAC
 1201 1260
 CTATTATAAACGCTCCGAATCTGCAACCTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTA
 1261 1299
 CCATCTGGCCCACAGCGTTCTCACTAGCTATGCTACAT

(4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域又はアミラーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域を有する請求項1記載のDNA。

(5) 請求項1～4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼY_a酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。

(6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した微生物。

(7) 微生物がバチルス属細菌である請求項6記載の微生物。

(8) 請求項6又は7記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼY_aを採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼY_aの製造方法。

(9) 微生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項8記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れ、洗浄力の改善に寄与しうるY_a酵素（特開昭61-280278号）の遺伝子をコードするDNA断片及び該断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてY_a酵素を製造する方法に関する。

〔従来の技術〕

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたY_a酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活するような高pH液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Y_a酵素は、バチルス・エスピ－Y株（Bacillus sp. Y）（微研菌密第8088号）を培養することにより、その培養物中に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテアーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、

紫外線照射等による変異処理等を用いた菌株の育種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いた γ a酵素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピ- γ 株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

[発明が解決しようとする課題]

γ a酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピ- γ 株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることにより γ a酵素の生産性の向上に利用できる γ a酵素をコードする遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて γ a酵素の生産性を向上させうる方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

本発明は、 γ a酵素生産菌より γ a酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することにより、又 γ a酵素遺伝子即ち γ a酵素のプロモーターからシグナルペプチド、前駆体領域、成熟酵素領域及びターミネーターまでをコードする領域を含むDNA断片を適当な宿主菌に導入することにより γ a酵素を生産し、さらにはプロモーター領域(以下、プロモーター領域とは一般的に大腸菌等で定義されるコンセンサス配列に加えて構造遺伝子の直前にあるShine-Dalgarno配列を含む転写及び翻訳に関与する5'末端非翻訳領域とする。)を、その宿主菌において効率よく作動するような他の遺伝子由来のプロモーター領域に置換することにより γ a酵素を高生産化できることを見出し、該知見に基づいて完成された。

本発明に係る γ a酵素遺伝子は、第1図に示す

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中には、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基目～635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク質に相当し、本発明において重要である。つまり、本発明によれば上記203～635(成熟酵素領域)残基の上流に位置するプロモーター領域、分泌のための領域等を公知の手段により他の蛋白質をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率的に γ a酵素を製造することができる。この際、本発明では、203～635残基の上流に位置するプロモーター領域をバチルス属細菌で強力に機能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、例えばバチルス属細菌由来の中性又はアルカリプロテーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、これをバチルス属細菌に導入することによって、中性領域(pH 6～8近辺)で培養することにより γ a酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、 γ a酵素遺伝子のク

ローニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、 γ a酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピ- γ 株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、 γ a酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によって γ a酵素遺伝子をクローニングすることができる。

γ a酵素生産菌、例えばバチルス・エスピ- γ 株から γ a酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られた γ a酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、 γ a酵素生産菌より染色体DNAを抽出する。用いる菌株としては γ a酵素を生産する菌株であればいかなる菌株でも構わないが、例えばバチルス・エスピ- γ 株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトウーミウラ

の方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) 等によって調製することができる。

このように取得した染色体DNAをEcoRI、XbaIなどの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Molecular Cloning, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.31 (1989)) を行ない、DNAプローブの相補性及びその相補

するDNA断片の大きさを特定する。染色体DNAを消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。DNAプローブは α -³²P-ATPを用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDEAEベーパー法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989)) を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと相補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりYa酵素遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したYa酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってYa酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに限定されるのではなく、本発明により明らかにされたYa酵素のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴である耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のYa酵素の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA配列及びアミノ酸配列に入為的な挿入、欠失、置換等を行なうことにより改造することは可能であり、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵素蛋白質も含まれる。

さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一の制限酵素で消化する。さらにアルカリフェヌルターゼで脱糖酸したのち同一の制限酵素認識部位を有するDNA断片とT4リガーゼにより連結することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNA Cloning Vol. 1 IRL Press, p. 109 (1985)) に準じて大腸菌に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からYa酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90 (1989)) 等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリ-SDS法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25 (1989)) を用いて

Ya酵素遺伝子を発現させるために、Ya酵素遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌としては、大腸菌、バチルス属、シュウドモナス (Pseudomonas)属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus)属、サッカロマイセス (Saccharomyces)属、キャンジダ (Candida)属等の微生物があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えばバチルス属を宿主菌とした場合、Ya酵素遺伝子を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、pBD64等を消化し、これとYa酵素遺伝子をT4リガーゼを用いて連結させる。この反応物をプロトプラスト法 (S. Chang, Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979)) を用いてバチルス属細胞に導入することができる。Ya酵素遺伝子を含むDNAを導入した宿主菌を培養し、その培養物よりYa酵素を取得する。Ya酵素の発現の確認及びその発現量はウエスタン・ブロッティング、蛋白質分解力の測定等により行なうことができる。

γ -a 酵素の生産性を増大させるためには、プロモーター領域を宿主菌にとって効率のよいプロモーター領域と交換して発現させることにより、生産性を増大させることができる。例えばバチルス属細菌由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域等が好都合である。例えば γ -a 酵素遺伝子由来のプロモーター領域をバチルス・ライヘンホルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。そして、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBclI 認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモーター領域の切除及びT4リガーゼを用いた連結等を行なうことによりプロモーター領域の交換を行なうことができる。さらにプロモーター領域の交換を行なった γ -a 酵素遺伝子をバチルス・サテルス (*Bacillus Subtilis*) に導入し、培養を行なうことにより γ -a 酵素を生産させる。これにより

もとの γ -a 酵素遺伝子由来のプロモーター領域を用いた場合に比べて生産性を増大させることができる。

上記に示す手続によりプロモーター領域を交換した γ -a 酵素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サテルスを用いて γ -a 酵素の極めて高い生産性を獲得することができる。

上記バチルス・サテルスは、上記バチルス・サテルスが生育できる培地であればいずれでもかまわぬが、例えば炭素源としてグルコース、澱粉、糖蜜等、窒素源としてはペプトン、ポリペプトンS、大豆粉、コーンスティーブリカー等、さらにミネラル等を含む培地を用いて温度30-40℃、50-100時間培養することができる。また培養物から陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等により、 γ -a 酵素を精製できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[実施例]

実施例 1

ザンハイブリダイゼーション

γ -a 酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアブライド・バイオ・システムズ社 (AB社) 製プロテインシーカンサー 377Aを用いて決定した。結果は以下に示す通りであった。

N'-AsnAspValAlaArgGlylleValLysAlaAspValAla
GlnAsnAsnTyrGly

γ -a 酵素の中央部ないしC末端領域のアミノ酸配列を解析するため、トリプシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結果を以下に示す。

N'-LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン塩に基いて以下に示すオリゴヌクレオチドDNAをAB社製DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T

プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGGACATCGC 3'
G G C

A T
プローブC: 5' GTICCIICCCATATAIGC TA TT 3'
G C

上記プローブについては、 $\tau-^{32}P-dATP$ (アマシャム社製) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を用いて5'末端を ^{32}P で標識した。

バチルス・エスピード株を Na_2CO_3 1.0 g /lを含むブイヨン培地 (極東製薬社製) 200 mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で終夜培養した。菌体約2gを取得し、サイトウーミウラの方法に準じて染色体DNAを2.8 mg調製した。このDNA 1.0 μ gをEcoRI (制限酵素はすべて宝酒造製) またはXbaIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、先に調製したプローブNを用いてザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、EcoRIで消化した染色体DNA断片では、約2.8 Kbp のDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2 Kbp のDNA断片がハイブリダイズした。さらに同操作をプローブCにつ

いても行なったところ、EcoR Iで消化した染色体DNA断片では約2.0 KbpのDNA断片が、またXba Iで消化した断片では約1.2 KbpのDNA断片がハイブリダイズした。

クローニング

前述の染色体DNA 200 μgをEcoR Iで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8 KbpのDNA断片をDEAEベーバー法を用いて20 μg回収した。また約2.0 KbpのDNA断片についても同様の操作を行ない20 μg回収した。染色体DNA 200 μgをXba Iで消化し同様の操作を行ない約1.2 KbpのDNA断片を10 μg回収した。pBR328(ベーリンガー社製)1 μgをEcoR Iで消化しアルカリフォスファターゼ(ベーリンガー社製)で脱磷酸後、フェノール抽出、すなわちフェノール-クロロホルム混液(1:1)を加え蛋白質変性を行ない、遠心分離後上清を回収する操作を行なった。さらにエタノール沈殿、すなわち0.1倍量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)及び2倍量のエタノールを加え-80

℃10分冷却後遠心分離によりDNAを回収する操作を行なった。このうち0.2 μgと前述の約2.8 KbpのEcoR I断片0.05 μgをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌HB101株に導入した。生育した形質転換体500株よりアルカリ-SDS法を用いてDNAを抽出し、前記のプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYT101(第2図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。さらに約2 KbpのEcoR I断片についても前述のプローブCを用いて同様の操作を行ない、プローブCとハイブリダイズするプラスミドpYB2(第3図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。また、pUC118(宝酒造社製)1 μgをXba Iで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった。このうち0.2 μgと前述の約1.2 KbpのXba I断片0.05 μgを

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の操作をプローブNを用いて行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYX1(第4図)を見いだし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。

塩基配列の決定

取得したプラスミドpYT101、pYB2及びpYX1のY_a酵素遺伝子の一部をpUC118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本鎖DNAを調製した。この1本鎖DNAとα-³³S-dCTP(アマシャム社製>37TBq/mmol)及びSEQUENASE(東洋精社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218 bpから2122 bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のY_a酵素のプロネンシーケンサーによるアミノ酸配列の解析により確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203残基目からと448残基目からに見いだせる。ま

たN末端が203残基目から始まることから、翻訳開始から202残基目までが前駆体領域であり、203残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

実施例 2

プロモーターの取得

バテルス・ライヘンホルミスLB8907株をブイヨン培地200 mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で終夜培養を行ない、菌体約1 gを得し、サイトウ-ミウラの方法に準じて染色体DNAを2.0 mg調製した。このうち50 μgをEcoR Iで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった。pUC118 1 μgをEcoR Iで消化後アルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸し、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、このうち0.2 μgと染色体DNAのEcoR I断片0.05 μgをライゲーションキットを用いて連結し、この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体を1%サツマイモデンプン(純正化学社製)を含む

し培地（バクトトリプトン 1.0 g／l、バクトイーストエキス 5 g／l、NaCl 2.5 g／l、バクタガード 2.0 g／l、アンビシリン 1.0 mg／l、pH7.2）に植菌し 37℃で約 40 時間培養した。その結果形質転換体 2000 株より、デンプンを分解する、即ちアミラーゼ遺伝子を有する菌株を 1 株取得した。この菌株が保持するプラスミド pTA1 (第 5 図) のプロモーター領域の塩基配列を実施例 1 に準じて決定し、その結果を第 6 図に示す。

Y_a 酶素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミド pYB2 5.0 μg を EcoRI 及び SphI で消化し DEAE ベーパー法を用いて約 2 Kbp の DNA 断片を回収した。そのうち 0.05 μg と、あらかじめ EcoRI 、 SphI で消化したアルカリフェヌルファターゼを用いて脱塩酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収した pUC118 0.2 μg をライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 JM109 株に導入した。生

育した形質転換体の中から第 7 図に示す pUC118ES を保持する菌株を取得した。 pYT101 5.0 μg を EcoRI で消化し DEAE ベーパー法を用いて約 2.7 Kbp の DNA 断片を回収した。そのうち 0.05 μg と、あらかじめ EcoRI で消化しアルカリフェヌルファターゼを用いて脱塩酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収した pUC118ES 0.2 μg をライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 JM109 株に導入し、生育した形質転換体の中から第 7 図に示す pTB3 を保持する菌株を取得した。

A BI 社製 DNA 合成装置 381A 型を用いて下記に示す DNA プローブ (第 1 図の 1181-1210 bp に対応) を合成し、

5' -CCAAGAGTTAGTATGGATTCTTGCTCCAGC -3'

宝酒造社製部位特異的変異法キット Mutan-K を用いて、 pTB3 の Y_a 酶素のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を変更し、 EcoRI 部位を消失させたプラスミド pTB3E を取得した。さらに下記

に示す DNA プローブ (第 1 図の 200-229 bp に対応) を合成し、

5' -TTTCCCCCTTCATTGATCATCAACTCCTCAT -3'

同様にして塩基配列を変更し、 Y_a 酶素翻訳開始コドン上流に BclI 認識部位を作製したプラスミド pTB3EB を取得した。

また下記に示す DNA プローブを合成し、 (第 6 図の 216-245 bp に対応) を合成し、

5' -TGTGTTTCATGATCATCCTCCCCCTTCAA -3'

同様にして pTA1 の塩基配列を変更し、プロモーター領域下流に BclI 認識部位を持つプラスミド pTA1B を作製した。

pUC118 1 μg を EcoRI で消化しアルカリフェヌルファターゼで脱塩酸後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち 0.2 μg とあらかじめ EcoRI で消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行い回収した pUB110 0.05 μg をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 JM109 株に導入した。生育した形

質転換体の中から第 8 図に示すプラスミド pUB81 を保持する菌株を取得した。 pTB3E 5 μg を EcoRI で消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった後、クレノウフラグメント (宝酒造社製) を用いて DNA 末端を平滑化した。さらにフェノール抽出、エタノール沈殿を行い、このうち 0.2 μg と SphI リンカー (ニューイングランドバイオラブ社製) 5.0 ng をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法を用いて大腸菌 JM109 株に導入した。生育した形質転換体のうち SphI 認識部位が新たに作製されたプラスミド pTB3ES (第 8 図) を保持する菌株を取得した。 pTB3ES 5.0 μg を SphI で消化し、 DEAE ベーパー法を用いて 4.6 Kbp の DNA 断片を回収した。この DNA 断片 0.05 μg と、 SphI で消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった pUB81 0.2 μg とをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をプロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス 1012 株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8図に示すプラスミド pUB8Yを保持する菌株を取得した。

pTA1B 5.0 μgをEcoRI及びBclIで消化し、DEAEペーパー法を用いて約1KbpのDNA断片を回収した。pTB3EB 1 μgをEcoRI及びBclIで消化しアルカリフェヌカルボキシラーゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち0.2 μgと前記のpTA1B由来の1Kbp DNA断片0.05 μgとをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミドpAY1を保持する菌株を取得した。

pAY1 5.0 μgをSphI、さらにベクター側のフラグメントを分断するためXbaIで消化し、DEAEペーパー法を用いて約3.5KbのDNA断片を回収した。pUB8A 1 μgをSphIで消化しアルカリフェヌカルボキシラーゼで脱磷酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を1アルカリプロテアーゼ単位(APU)とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表-1に示す。pUB8Yを保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、pUB110を保持する形質転換体に比べて約3倍高く、またpUB8Aを保持する形質転換体は、pUB8Yを保持する形質転換体に比べて約30倍の高いYa酵素の生産性を示した。

このうち0.2 μgと前述したpAY1由来の3.5Kb DNA断片0.05 μgをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物を、プロトプラス法を用いてバチルス・サチルス1012株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミドpUB8Aを保持する菌株を取得した。

Ya酵素の発現

pUB110、pUB8Y、pUB8Aを保持するバチルス・サチルス1012株の形質転換体を以下に組成を示す培地(栄養粉9.0g/l、ポリペプトンS(大正栄養社製)5.0g/l、KH₂PO₄5g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2g/l、硫酸カナマイシン5.0mg/l、pH 7.5)を含む坂口フラスコに植菌し33℃にて90時間培養した。培養上清のアルカリプロテアーゼ活性はアンソニー萩原の方法(Hagiwara, B., J. Biochem. 45, 188 (1958))に準じて測定した。すなわち35℃、pH 10.5の条件下で10分間反応し、1分間にテロシン1 μg相当量

表 1

	APU/ml
Bacillus subtilis 1012 (pUB8Y)	850
(pUB8A)	25400
(pUB110)	320

4. 図面の簡単な説明

第1図は、Ya酵素遺伝子の構造遺伝子領域の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Ya酵素遺伝子のうち構造遺伝子のN末端側及びプロモーター領域を保持するプラスミドpYT101の制限酵素切断地図である。

第3図は、Ya酵素遺伝子のうち構造遺伝子C末端側及びターミネーター領域を保持するプラスミドpYB2の制限酵素切断地図である。

第4図は、Ya酵素遺伝子のうち構造遺伝子中央部を保持するプラスミドpYX1の制限酵素切

断面図である。

第5図は、バチルス・ライヘンホルミスLB6907より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラスミドpTA1の制限酵素切断面図である。

第6図は、バチルス・ライヘンホルミスLB6907より単離したアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域とその遺伝子配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第7図は、pYT101とpYB2のYa酵素遺伝子の領域を連結したプラスミドpTB3の作製行程図である。

第8図は、pTB3のうちYa酵素遺伝子の領域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Yの作製行程図である。

第9図は、pTB3EBのYa酵素遺伝子のプロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換し、バチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB8Aの作製行程図である。

回転の準備

第1 図 Ya酵素遺伝子 遺伝子配列とアミノ酸配列 (その1)

GGATCCAGTACATTGGCTAAAGCTGCTAGCGGTGTTCTGAAGAAACAAATGCCCTTTC	64	B a : BamH I	B c : Bcl I
TTCCTTAAACTAAATGCAATTGCTTCCATTGGAAAATAGGAGAAAAAGCATTCGATAGC	65	B g : Bgl I I	C : Cla I
AATGAAATACGTGATTCCAAATCCGAAACGGTTCCTATCTATTTAAATGAAAG	130	E : EcoR I	H : Hind III
131	K : Kpn I	P : Pst I	
132	S : Sph I	X b : Xba I	
133	X m : Xma I		
134	AP : アルカリフェヌファターゼ		
135	MCS : マルチクローニングサイト		
136	Ap' : アンピシリン耐性遺伝子		
137	Tc' : テトラサイクリン耐性遺伝子		
138	ori : 複製領域		
139			
140			
141			
142			
143			
144			
145			
146			
147			
148			
149			
150			
151			
152			
153			
154			
155			
156			
157			
158			
159			
160			
161			
162			
163			
164			
165			
166			
167			
168			
169			
170			
171			
172			
173			
174			
175			
176			
177			
178			
179			
180			
181			
182			
183			
184			
185			
186			
187			
188			
189			
190			
191			
192			
193			
194			
195			
196			
197			
198			
199			
200			
201			
202			
203			
204			
205			
206			
207			
208			
209			
210			
211			
212			
213			
214			
215			
216			
217			
218			
219			
220			
221			
222			
223			
224			
225			
226			
227			
228			
229			
230			
231			
232			
233			
234			
235			
236			
237			
238			
239			
240			
241			
242			
243			
244			
245			
246			
247			
248			
249			
250			
251			
252			
253			
254			
255			
256			
257			
258			
259			
260			
261			
262			
263			
264			
265			
266			
267			
268			
269			
270			
271			
272			
273			
274			
275			
276			
277			
278			
279			
280			
281			
282			
283			
284			
285			
286			
287			
288			
289			
290			
291			
292			
293			
294			
295			
296			
297			
298			
299			
300			
301			
302			
303			
304			
305			
306			
307			
308			
309			
310			
311			
312			
313			
314			
315			
316			
317			
318			
319			
320			
321			
322			
323			
324			
325			
326			
327			
328			
329			
330			
331			
332			
333			
334			
335			
336			
337			
338			
339			
340			
341			
342			
343			
344			
345			
346			
347			
348			
349			
350			
351			
352			
353			
354			
355			
356			
357			
358			
359			
360			
361			
362			
363			
364			
365			
366			
367			
368			
369			
370			
371			
372			
373			
374			
375			
376			
377			
378			
379			
380			
381			
382			
383			
384			
385			
386			
387			
388			
389			
390			
391			
392			
393			
394			
395			
396			
397			
398			
399			
400			
401			
402			
403			
404			
405			
406			
407			
408			
409			
410			
411			
412			
413			
414			
415			
416			
417			
418			
419			
420			
421			
422			
423			
424			
425			
426			
427			
428			
429			
430			
431			
432			
433			
434			
435			
436			
437			
438			
439			
440			
441			
442			
443			
444			
445			
446			
447			
448			
449			
450			
451			
452			
453			
454			
455			
456			
457			
458			
459			
460			
461			
462			
463			
464			
465			
466			
467			
468			
469			
470			
471			
472			
473			
474			
475			
476			
477			
478			
479			
480			
481			
482			
483			
484			
485			
486			
487			
488			
489			
490			
491			
492			
493			
494			
495			
496			
497			
498			
499			
500			
501			
502			
503			
504			
505			
506			
507			
508			
509			
510			
511			
512			
513			
514			
515			
516			
517			
518			
519			
520			
521			
522			
523			
524			
525			
526			
527			
528			
529			
530			
531			
532			
533			
534			
535			
536			
537			
538			
539			
540			
541			
542			
543			
544			
545			
546			
547			
548			
549			
550			
551			
552			
553			
554			
555			
556			
557			
558			
559			
560			
561			
562			
563			
564			
565			
566			
567			
568			
569			
570			
571			
572			
573			
574			
575			
576			
577			
578			
579			
580			
581			
582			
583			
584			
585			
586			
587			
588			
589			
590			
591			
592			
593			
594			
595			
596			
597			
598			
599			
600			
601			
602			
603			
604			
605			
606			
607			
608			
609			
610			
611			
612			
613			
614			
615			
616			
617			
618			
619			
620			
621			
622			
623			
624			
625			
626			
627			

図面の添付

図 1 ベニバナ子 基配列とアミノ酸列(その3)

368	SerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysSerAlaLeuThrValGlyAlaThrGluAsnTyr TCACCAACATTACTCCCTCAGGTACGGAAATGGTATACCGTGCCAACTGGAAACTAT 1319	148	SerGlyIleLeuThrIleGlyAlaSerGlnLeuValGlnAlaValIleLeuAsnThrValGlyLeu CCTAGGTTAACGAGGGCTGCCAGCTCTCACGGCTTATTAATAACAAACCAA 659
390	AlaProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAlaSerIleAlaGlnPheSerSerArgYta CGCCACCCTTCGTTCTCGTACGATACGATAACCCAAATCATATGCCACAAITTCATCGAGGACCT 1385	411	AsnLysSerIleLysPheThrGlyLeuAspGluIleValGlnTyrAlaAlaAsnAspValLeu AATAAAACATGAAATTACCGTTAGATGAGATCTTAAATCAATAATCATGCGCT 724
390	AlaProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAlaSerIleAlaGlnPheSerSerArgYta CGCCACCCTTCGTTCTCGTACGATACGATAACCCAAATCATATGCCACAAITTCATCGAGGACCT 1385	412	AsnLysSerIleLysPheThrGlyLeuAspGluIleValGlnTyrAlaAlaAsnAspValLeu AATAAAACATGAAATTACCGTTAGATGAGATCTTAAATCAATAATCATGCGCT 724
390	AlaProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAlaSerIleAlaGlnPheSerSerArgYta CGCCACCCTTCGTTCTCGTACGATACGATAACCCAAATCATATGCCACAAITTCATCGAGGACCT 1385	412	AsnLysSerIleLysPheThrGlyLeuAspGluIleValGlnTyrAlaAlaAsnAspValLeu AATAAAACATGAAATTACCGTTAGATGAGATCTTAAATCAATAATCATGCGCT 724
412	ThrAlaAspGlyIleValGlyLysProAspValThrIleProGlyThrPheLeuSerAlaAspSer ACGAGCCATGGCAAAATTAAGCCCTACGCTACGAACTCCCTGGAAACATTTTATACCGCTAC 1451	419	TyrIleSerProGlyIleValGlyLysProAspValIleValGlyIleValIleValIleAspValIleAsp TATATATCCAAAGCCCAGATATGCCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 781
412	ThrAlaAspGlyIleValGlyLysProAspValThrIleProGlyThrPheLeuSerAlaAspSer ACGAGCCATGGCAAAATTAAGCCCTACGCTACGAACTCCCTGGAAACATTTTATACCGCTAC 1451	419	TyrIleSerProGlyIleValGlyLysProAspValIleValGlyIleValIleValIleAspValIleAsp TATATATCCAAAGCCCAGATATGCCATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 781
440	SerLysAlaProAspSerSerPheIleAlaAsnTyrAlaSerTyrAlaSerTyrAlaSerTyrAla TCCATTAAGCTTCAGACTCTTCGTTGGCCGATTTATAGCTAAATGCCATATGCCATATGCCATAC 1487	455	ValAlaGlnAsnAspIleGlyLeuTyrIleGlyGlnGlyIleValGlnAlaValIleAspThrGlyLeu GTCGACAAAACANTTACGGTATATGCCATAGCTGAACTGAGCTAACATGCTGAGGCTAACACGCTA 857
440	SerLysAlaProAspSerSerPheIleAlaAsnTyrAlaSerTyrAlaSerTyrAlaSerTyrAla TCCATTAAGCTTCAGACTCTTCGTTGGCCGATTTATAGCTAAATGCCATATGCCATATGCCATAC 1487	455	ValAlaGlnAsnAspIleGlyLeuTyrIleGlyGlnGlyIleValGlnAlaValIleAspThrGlyLeu GTCGACAAAACANTTACGGTATATGCCATAGCTGAACTGAGCTAACATGCTGAGGCTAACACGCTA 857
458	SerThrIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer TCCATGGCAACCTTATGTCAGCCGATTTATAGCTAAATGCCATATGCCATATGCCATAC 1583	477	AspThrGlyArgAsnAspSerSerHemIleGluIlePheAspGlyIleValIleAspThrGlyLeu GATCAGGCTAACCATAGCTGATCTTAACTGAGCATGCTAACATGCTGAGGCTAACACGCTATTCATGG 923
458	SerThrIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer TCCATGGCAACCTTATGTCAGCCGATTTATAGCTAAATGCCATATGCCATATGCCATAC 1583	477	AspThrGlyArgAsnAspSerSerHemIleGluIlePheAspGlyIleValIleAspThrGlyLeu GATCAGGCTAACCATAGCTGATCTTAACTGAGCATGCTAACATGCTGAGGCTAACACGCTATTCATGG 923
478	CysIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer CGTATTACTCTTAAGCCCTCTTATAAACCTGGACTACTGGCTCTTACCTGATGCTGGTTA 1649	499	LeuIleIleIleThrAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer TIAAGAAAGAACATIATGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTG 888
478	CysIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer CGTATTACTCTTAAGCCCTCTTATAAACCTGGACTACTGGCTCTTACCTGATGCTGGTTA 1649	499	LeuIleIleIleThrAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer TIAAGAAAGAACATIATGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTG 888
500	CysIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer CGTATTACTCTTAAGCCCTCTTATAAACCTGGACTACTGGCTCTTACCTGATGCTGGTTA 1649	521	GlyAsnDalaLeuAsnLysGlyMetAlaProGlnIleAsnLeuIlePheGlySerIleLeuAspSer GGTAAATCTTAAATAAAGGATGGCTCCGAGCTGACTTACGCTGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1055
500	CysIleIleThrProIleValGlyIleValIleGlyLeuAspIleAspSerIleAspSerIleAspSer CGTATTACTCTTAAGCCCTCTTATAAACCTGGACTACTGGCTCTTACCTGATGCTGGTTA 1649	521	GlyAsnDalaLeuAsnLysGlyMetAlaProGlnIleAsnLeuIlePheGlySerIleLeuAspSer GGTAAATCTTAAATAAAGGATGGCTCCGAGCTGACTTACGCTGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1055
522	ValAsnGluIleThrAlaLeuIleThrGlyGlnIleAsnIleThrIleSerIleGlnAlaGlnAlaGly GCAATGAAACACTGCATTAACCAACGCTGGGGCTTGCTGATCTGATGAACTGAACTGAACTGAACT 1715	543	SerGlyIleIleLeuAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GCGTAAATCTTAAATAAAGGATGGCTCCGAGCTGACTTACGCTGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1125
522	ValAsnGluIleThrAlaLeuIleThrGlyGlnIleAsnIleThrIleSerIleGlnAlaGlnAlaGly GCAATGAAACACTGCATTAACCAACGCTGGGGCTTGCTGATCTGATGAACTGAACTGAACTGAACT 1715	543	SerGlyIleIleLeuAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GCGTAAATCTTAAATAAAGGATGGCTCCGAGCTGACTTACGCTGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1125
1781	1781	1786	AlaAspGlyIleIleLeuAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GGGAGGATGATGAGCTTACCTGATGAGCTCTCTGAAAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1187
1781	1781	1786	AlaAspGlyIleIleLeuAspAsnAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GGGAGGATGATGAGCTTACCTGATGAGCTCTCTGAAAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1187
566	ValAsnAspLeuAspLeuIleIleThrAspAlaProAspGlyGlnIleAsnIleAspSer CTATGATTTAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1913	587	ValAspIleIleValIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GCTGATGATGAGCTTACCTGATGAGCTCTCTGAAAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1253
566	ValAsnAspLeuAspLeuIleIleThrAspAlaProAspGlyGlnIleAsnIleAspSer CTATGATTTAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1913	587	ValAspIleIleValIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSerIleAspSer GCTGATGATGAGCTTACCTGATGAGCTCTCTGAAAGCTACGCTAACATGCTAACATGCTAACATG 1253

図面の添付

第1 図 Y_{BT}遺伝子 基本配列とアミノ酸配列(図の1)

588 Tyr Pro TyrospAsnTrpaspGlyArgAsnValGluAsnValPheLeuAsnAlaProGln
TATCCCTATGATAATAACTGGATGGTCGCCAACATGTGAGACCTTATAAACCTCCGGAA 609
1979 631
610 Ser Gly Thr Tyr Ile Glu Val Gln Ala Tyr Asn Val Pro Ser Gly Pro Gln Arg Phe Ser Leu
TCTGGAACTGTATAATTGAGCTTAAGCTTAAATGACCATATGACCATCTGGCCCACAGCTTCTCACCA 2044
2045 2111
632 635 Alan Ile Val His
GCTATCGTACATTAATAATTTTAAATGAAAAAAACTAAGGATTTCACCTAGTTTTCGA 2176
2177 TTTTGTCAAACGATTATAATTTTCCACGACTATGGAAAGCTA

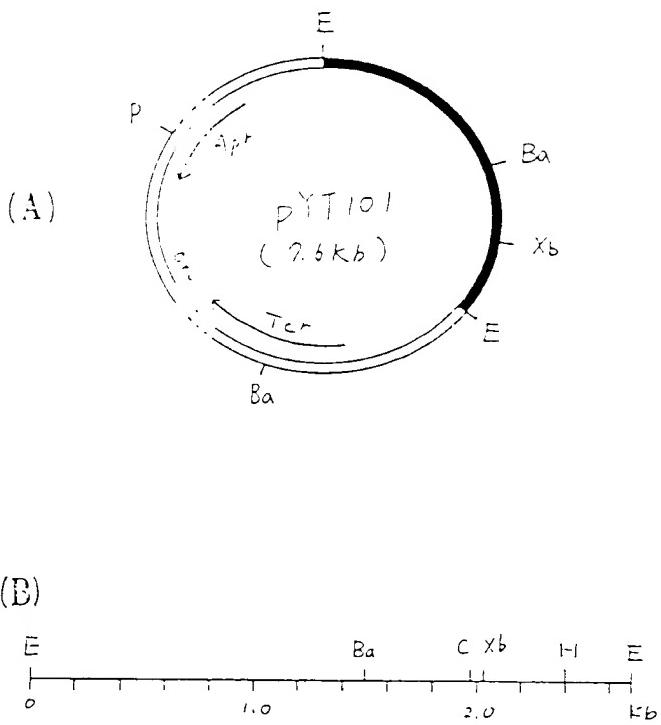


図2

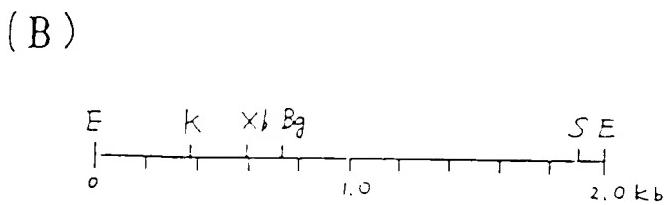
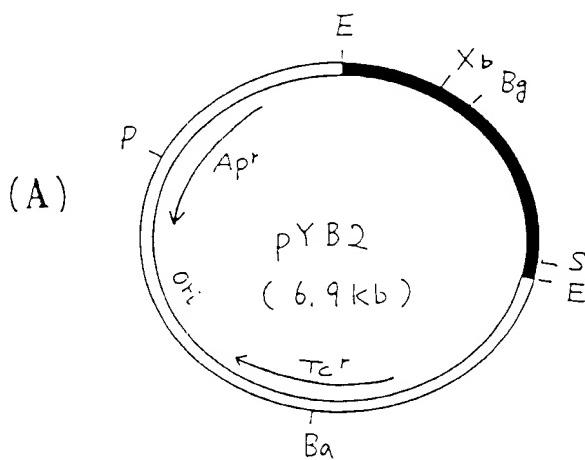


図3

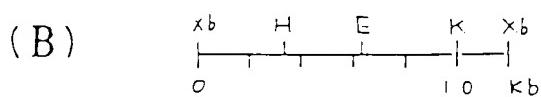
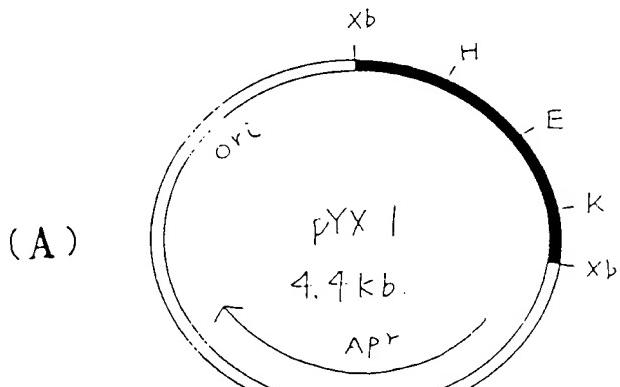
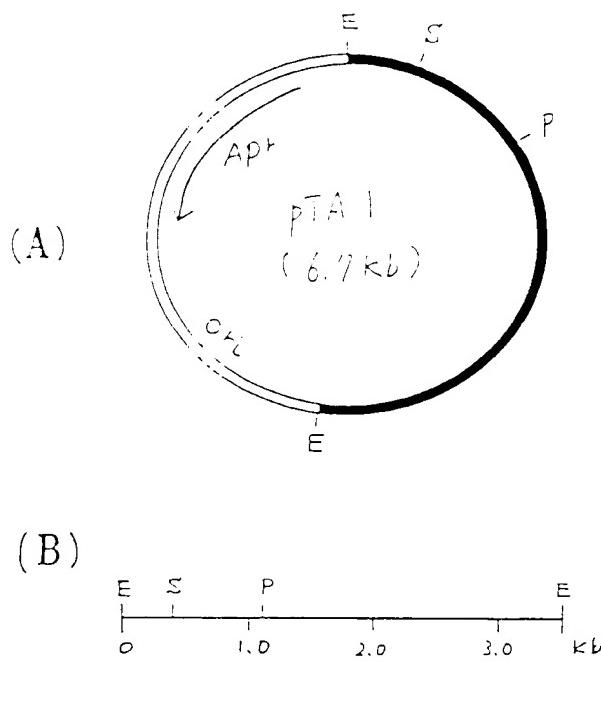


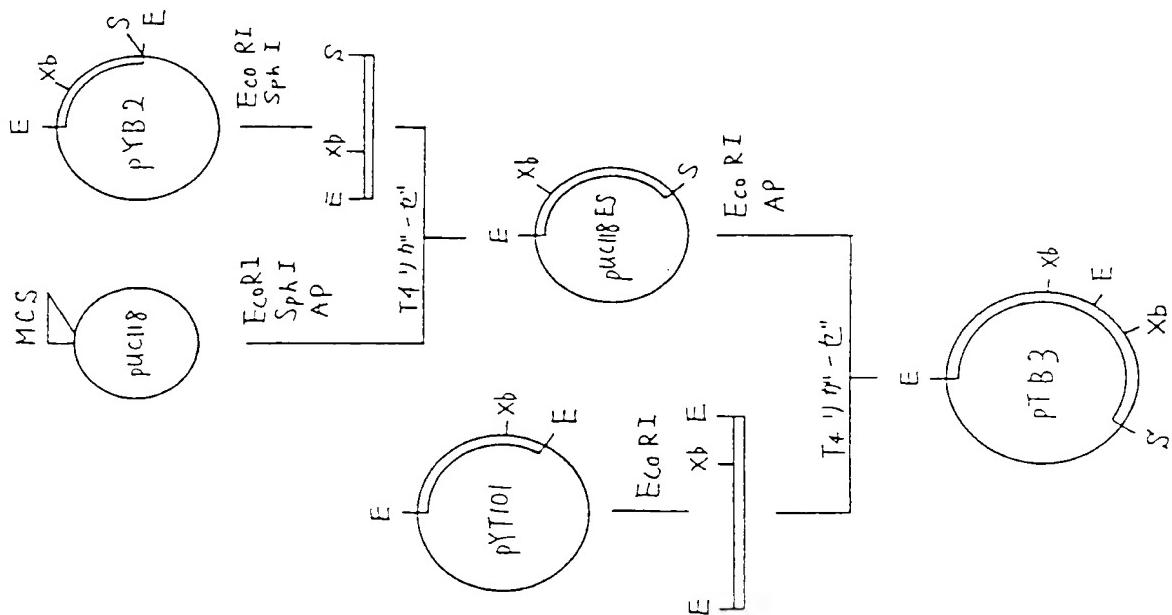
図4



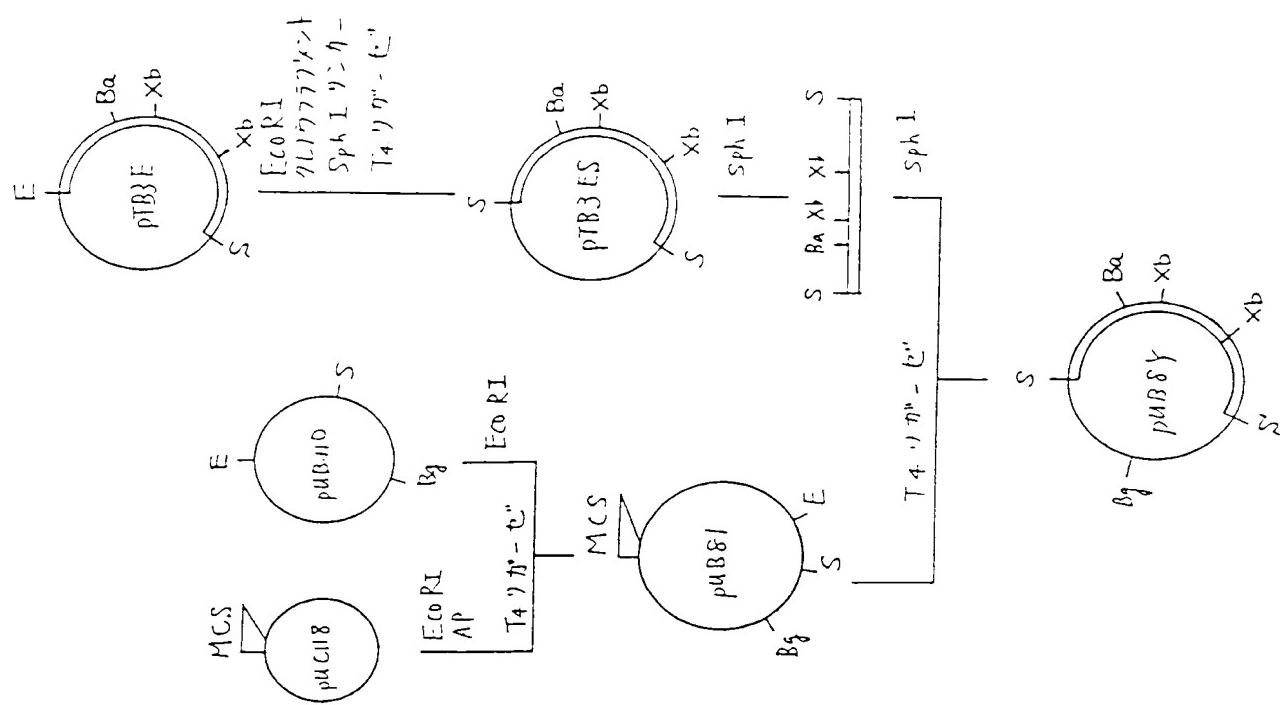
第6図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

CAACGTCGGAGATGCTGCTCAAGAGATTATAAAAAGCTGAAAGCAAAGGCTATCAATT
1 60
 CGTAACTGTATCTCACCTTGAACAAGTGAACAACGAGAGAGGCTATTCAATAATGACTA
61 120
 GAAAGCCCCATATCGCTTTCTTTGCAAGAAAATATAGGAAAATGGTATTGTTAAAAA
121 180
 1 2
 MetLys
 ATTCTGAATATTATACAAATATCATATTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAACATGAAA
181 240
 3 33
 GluGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu
 CAACAAAAACGGCTTACCCCCGATTGCTGCCGCTTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTG
241 300
 34 37
 ProHisSerAla
 CCTCATTCTCCA
 301 312

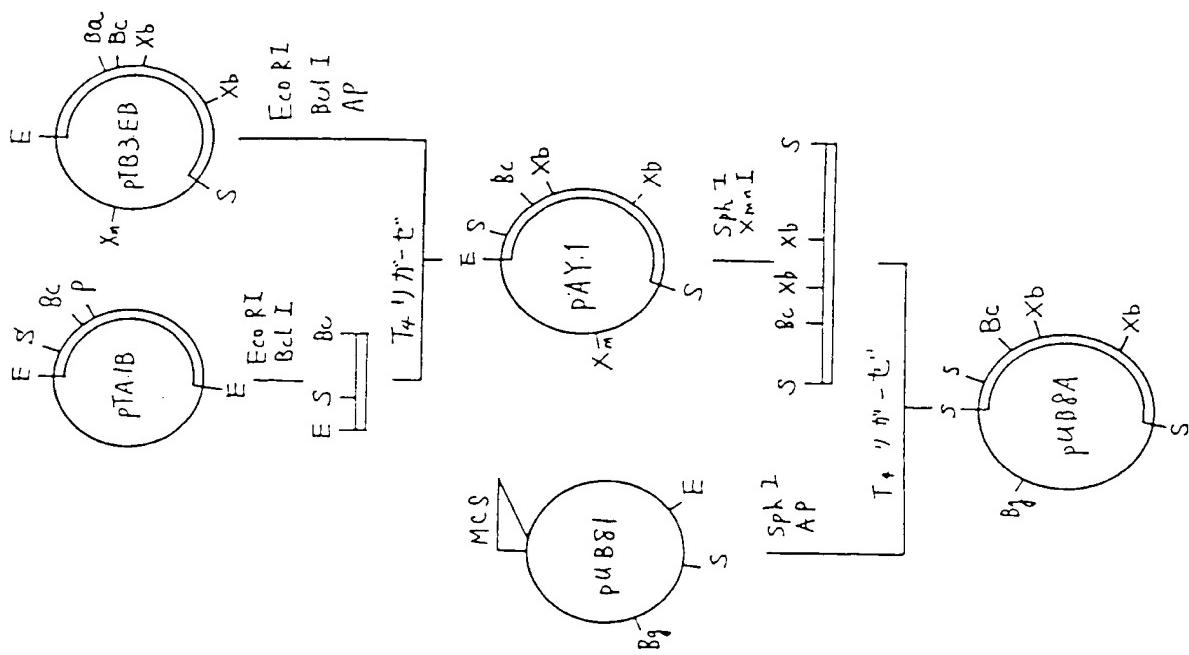
第5図



第7図



第8回



9

特開平4-197182 (14)

手 続 補 正 書 (方式)

平成 3. 8. 27 月

特許庁長官 植 松 敏 殿

1. 事件の表示 平成 2 年特許願第 327110 号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y_a 酶素を
コードする DNA 及び該 DNA の
製造方法

3. 補正をする者 事件との関係 出願人

名 称 (676) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号
電話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5. 補正命令の日付 平成 3 年 3 月 12 日

6. 補正の対象 図 面

7. 補正の内容

図面の第 1 図 (その 1)、(その 2)、(その 3)、
を別紙の通り補正する

手 続 補 正 書 (方

平成 3. 8. 27 月 日

特許庁長官 植 松 敏 殿

1. 事件の表示 平成 2 年特許願第 327110 号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y_a 酶素を
コードする DNA 及び該 DNA の
製造方法

3. 補正をする者 事件との関係 出願人

名 称 (676) ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号
電話 (代) 3211-8741

氏 名 (5995) 弁理士 中 村

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄
図 面

7. 補正の内容

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	行	誤	正
6	下から 4	計算	生産
11	10	染色体菌	染色体
15	下から 2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンスティ ープリカーラー	コーンスティ ープリカーラー
21	下から 4 ~ 3	プロネンシ クエンサー	プロテインシ クエンサー

(2) 図面の第 1 図 (その 1)、(その 2)、
第 6 図及び第 9 図を別紙の通り補正する。

第 1 図 ベニヌードウ胚葉細胞とアミノ酸配列 (図2)

148 ProGluLeuThrLysGlyAlaSerGlnLeuValGlnAlaValIleLeuAsnThrLysIleGlu
CCTGAGCTTAAAGGAGGCTCCACCTGTCAGGGTTATTAAATACAAACAGGA
659 169
170 AsnLysIsoleLysPheThrGlyLeuIleGluIleValGlnTyraAlaAsnAsnAspValleu
AATAAAACATGAAATTACCGGTAGATGAGATCATCGTCATATGCCAAATAATGATGCTT
724 191
192 TyrosSerProLysProGluIleMetAsnAspValIleArgGlyIleValIleLysAlaAsp
TATATACCAAGCCCAGATGAGCTATGATCATGTCAGCAGGGATAGCTAAAGCTAT
791 213
214 ValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuIleTyrGlyGlnGlyInGlyIleValAlaAspThrIleLeu
GTTGCACAAAACATTACCGATTATGACAGTCACACTGCTGAGCTAGGGCACAGGCC
857 235
236 AspThrGlyArgAsnAspSerSerMetHisGluIlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyraAla
GATACAGCTAACCATGCTCTATGCCATGAGCATCCGGAAATCACCGCTTACCG
923 988
258 LeuGlyArgThrAspAsnAlaSerAspSerGlyIleIleHistValAlaGlySerValleu
TTAGGAGAACCTAAATGCCGATGCTGCGATGCCACATGCCGCTGCTACT
989 1054
280 GlyAsnAlaLeuAsnLysGlyIleIlaProGlnAlaAspLeuValPheGlnSerIleLeuAspSer
GGTAAATCTTAAATAAAGGATGCCGAGCTACTTAGCTCTCCAACTCTTATGCC
1055 1125
302 SerGlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuAspSerGlnAlaThrAsnAlaLys
ACGGAGGATTAAGGTCCTACCATGCCAACTTAATCGTTATAGCTTAACTGCC
1126 1186
324 AlaAspGlyIleHistAsnSerTyrGlyIlaProValAspGlyIleValAspSerGln
GCAAGAAATCACTAACTCTGGGAGCCCCAGTAAATGACCGTACACTGCTTAACTGCC
1187 1252
346 ValAspGlyIleValAlaAspIleThrValLeuPheAlaAlaGlyAspGluGlyProAsn
GCGGATGAGATGTCGAATAATGATATGCCGTACTTTCACCTGGTAAATGAAAGGCTTAAT
1253 1318

第 1 図 ベニヌードウ胚葉細胞とアミノ酸配列 (図2)

1 CGATCCACTACATTTCGGTAACCTCTCTAGCCGTGTTCTGAAA,AACAAATGACCTTTTT
1 TIGTTTAACTAATTGCTATCTTTCATGCGAAAATAGCAGAAAAAGCTTCCGATAGC
64 130
65 AAATGAAATGACTGAATTCCCAATACCCGAACAGGTTCTCTCTGCTATCTTAAATGAAATG
131 196
1 AAGATGAGGACTTCACCAAAATGAGCTTAACTGAGCTTAACTGAGCTTAACTGAGCTTAACTG
131 156
1 MetLysGlyLysIsoleGlyValValLeuSerValAlaSerAla
1 AGATGAGGACTTCACCAAAATGAGCTTAACTGAGCTTAACTGAGCTTAACTGAGCTTAACTG
197 262
16 AlaIleLeuAlaSerValIleValSerProThrSerGlyAlaAspSerGlnValAsnPheAsn
GCGATCTTACGGTCACTTAGGTAGTTACCCACTGCGAGCTTCAACGTTACGCTGAAATTAAAT
263 328
38 GlyValAsnSerLeuGluAsnAlaSerLeuValIleProLeuSerSerGlyGluAlaSerThrLeu
GCGTGAAAGCTTACAAATGCTACTCTTGTAAACCGATAACLTAGCCGCTGATGCTACGCTTCTA
329 394
60 ValAspThrGluAsnIleAsnIleProLysGlyIleGlnLysLeuGluAlaValGlnLysAsp
GTAGATCCGAAAATATTAAATCTTAAAGGTATTAAACCGATAACLTAGCCGCTGATGCTACGCTTCTA
395 460
82 AsnGluLeuThrIleValIleProLysGlyIleGlnLysLeuGluAlaValGlnLysAsp
461 103
104 AsnGluLeuThrIleValIleProLysGlyIleGlnLysLeuGluAlaValGlnLysAsp
527 125
126 LeuGlyValSerIleLeuAspIleValIleProAspIleAlaIleValGlnIleSerIleLeu
CTAGGAGTATCATTCTACAAATTACGGTCAACATTCAAGGAGCCAAAAGCTTACATACGCTGCTACA
527 592
126 LysAsnIleSerThrLeuIleSerValIleGluAsnValIleProPheIleProIleValIleSerIleLeu
147
346 ValAspGlyIleValAlaAspIleThrValLeuPheAlaAlaGlyAspGluGlyProAsn
GCGGATGAGATGTCGAATAATGATATGCCGTACTTTCACCTGGTAAATGAAAGGCTTAAT
658 1318

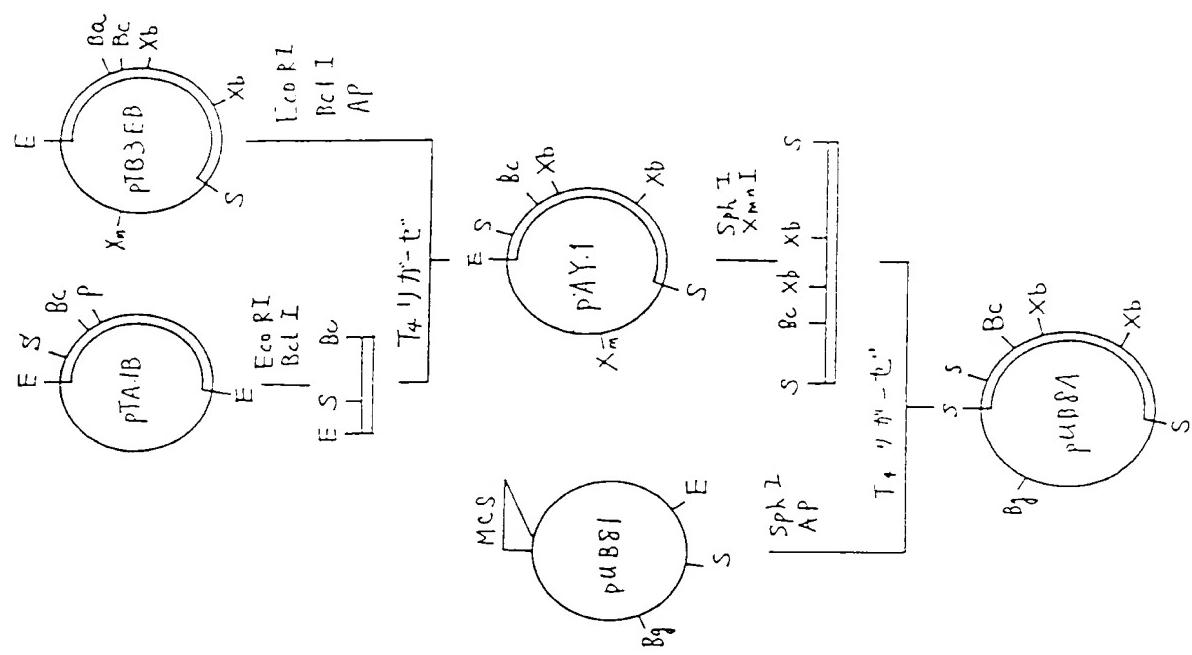
第 1 図 Y 基配子 基配列とアミノ酸配列(その4)

588	TyrProTyrAspAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsnValPheLeuAsnAlaProGln						
1979	TATCCCTATGATAATAACTGGATGGTCCCACAACTGTGAGAACCTATTATAAAGCCTCCGGAA	2044	631				
610	SerGlyThrTyrIleGlyuValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnAlaPheSerLeu	2110					
	TCTGGAAAGCTATATAATTGAGGTCAAGGCCATAATGTACCATATGGCCACAGGCTTCTCACTA						
	AAlaIleValIHS						
632	GCTATCGTCACATTAATAATTTTAAATGAGAAAAAAACTAAAGGATTTCACCTTAUUTTTCUUCAT	2176					
2111	TTTGTGTCACCACTTATATTTTCAGGACTATGGAAAGCTA						

第6回 アミラーが・アロモニーターに三子の名前を

<p>CAAGCTCCAGATCTCTGAGAGATTATAAAAGCTGAAGCAGAAAGCTATCAATT I</p> <p>GGTAACTGTACTCTAGCTGAAAGAAGTGAGAAGGAGAGGGCTATGATAATGTACIA 61</p> <p>GAAGAGCCCATATGCCCTTCCTCTCTGAGAAAATAGGAAAGATGGAAATCTGTTAAA 121</p> <p>ATTCGAGATATTTACAAATATCATATGTTACATGTTAGGGGGAGAGATCATGAAA 181</p> <p>GAGGIntySArgLysTyrAlaArgLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu 241</p> <p>CAACAAAAGGCTTACGCCCGATTTGCTGCCTCATCTTGTATTTGGCTCATCTTCTGCTG 300</p>	<p>60 I</p> <p>120 61</p> <p>180 121</p> <p>240 181</p> <p>300 34</p>	<p>1 2 HeLys</p> <p>33 3</p> <p>37 ProHissSerAla</p>
---	---	--

第 1 図 Y 的収退因子 基底配列とアミノ酸配列(図の3)



第9回